



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of:

Shinichi MOCHIZUKI *et al.*

Appln. No.: 09/834,008

Filing Date: April 12, 2001

For: **Bone Pathobolism Treating Agent**

Art Unit: 1653

Examiner: Chih Min KAM

Atty. Docket: 16991.008

Confirmation No.: 4949

**RECEIVED**

AUG 01 2003

**Claim of Priority Under 35 U.S.C. 119**

**TECH CENTER 1600/2900**


Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Applicants hereby claim the date of priority of Japanese Application No. 10-322874, filed October 28, 1998, as acknowledged in the declaration of the above-identified application.

A certified copy of the Japanese application is submitted herewith.

Respectfully submitted,

  
David R. Marsh (Reg. No. 41,408)  
Dawn Gardner Krosnick (Reg. No. 44,118)

Date: July 29, 2003

ARNOLD & PORTER  
555 Twelfth Street, N.W.  
Washington, D.C. 20004-1206  
(202) 942-5000 (telephone)  
(202) 942-5999 (facsimile)

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application: 1998年10月28日

出 願 番 号

Application Number: 平成10年特許願第322874号

[ ST.10/C ]:

[ JP 1998 - 322874 ]

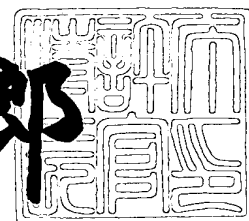
出 願 人

Applicant(s): 雪印乳業株式会社  
三共株式会社

2003年 6月27日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3051016

【書類名】 特許願

【整理番号】 SNMFP98383

【提出日】 平成10年10月28日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 A61K 35/16

【発明の名称】 骨代謝異常症治療剤

【請求項の数】 3

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町緑5丁目22番6号

【氏名】 望月 伸一

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋223-2 石橋ハイツ201

【氏名】 藤瀬 暢彰

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県下都賀郡石橋町石橋580-1

【氏名】 増山 千春

【発明者】

【住所又は居所】 栃木県河内郡南河内町祇園2-13-1 ダイヤパレス  
自治医大5番館407

【氏名】 津田 英資

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県川越市山田1769-10

【氏名】 東尾 侃二

【特許出願人】

【識別番号】 000006699

【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000001856

【氏名又は名称】 三共株式会社

【代理人】

【識別番号】 100090941

【氏名又は名称】 藤野 清也

【電話番号】 3226-6671

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014834

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 骨代謝異常症治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor)、その類縁体、又はその変異体からなる群から選択される一以上の物質、及び多糖類又はその誘導体からなる骨代謝異常症治療剤。

【請求項 2】 多糖類又はその誘導体がヘパリン又はデキストラン硫酸である請求項 1 記載の骨代謝異常症治療剤。

【請求項 3】 多糖類又はその誘導体を用いて、破骨細胞形成抑制因子の活性を高める方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、活性及びその持続性が高い新規な骨代謝異常症治療剤に関する。本発明の骨代謝異常症治療剤は、骨粗鬆症、高カルシウム血症、慢性関節リウマチ等の骨代謝異常症に対して優れた治療活性を有し、医薬として有用である。

【0002】

【従来技術】

骨は身体の支持能力だけでなく、生体内カルシウムの最大の貯蔵臓器として機能しており、生体に存在するカルシウムの99%は骨に蓄積されている。しかも、骨は絶えず骨吸収と骨形成という相反する作用を常に受けており、血清カルシウムの恒常性を保つ上で重要な役割を担っている。骨吸収において重要な役割を担っている破骨細胞が活性化されると、骨から過剰なカルシウムが血液中に流出し、血液中のカルシウムの恒常性が崩壊し、高カルシウム血症をきたすことが知られている。高カルシウム血症は癌の骨転移等により発症する疾患で、患者数の増加が予想され、その治療剤の開発が急がれている。現在、このような高カルシウム血症治療剤として、カルシトニン及びその誘導体、あるいはビスホスホネート系化合物が使用されている。しかし、これらの治療効果は満足できるものではなく、これらに代わる新規薬剤の開発が望まれている。

【0003】

一方、破骨細胞の分化を抑制する蛋白性因子として知られている破骨細胞形成抑制因子(Osteoclastogenesis Inhibitory Factor; OCIF) (W096/26217号公報)が、血清カルシウム低下作用を有することが報告されている (BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol.245, pp382-387(1998); Endocrinology, Vol.139, pp4012-4015(1998))。OCIFは、全く新しい高カルシウム血症治療剤として期待できるが、OCIFは蛋白質であるため生体内で速やかに代謝される。そこで、より安定で作用の強いOCIFの製剤の開発が望まれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、上述の状況に鑑み鋭意研究の結果、OCIFに多糖類を加え製剤化することにより、OCIFの有する骨代謝異常症に対する効果をさらに増強できることを見出した。従って本発明の課題は、OCIFの骨代謝異常症に対する効果をさらに増強し、その効果を持続せしめた骨代謝異常症治療剤を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明は、破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor; OCIF)、その類縁体、又はその変異体からなる群から選択される一以上の物質、及び多糖類又はその誘導体からなる骨代謝異常症治療剤に関する。

本発明において前記多糖類又はその誘導体としてヘパリンまたはデキストラン硫酸が用いられる。

本発明により、骨粗鬆症、高カルシウム血症、慢性関節リウマチ等の骨代謝異常症に対して優れた活性とその持続性とを有する治療剤が提供され、医薬として有用である。

また、本発明は多糖類又はその誘導体を用いることにより破骨細胞形成抑制因子の活性を高める方法に関する。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明は、破骨細胞形成抑制因子 (OCIF)、その類縁体、又はその変異体から

なる群から選択される一以上の物質、及び多糖類又はその誘導体からなる骨代謝異常症治療剤に関する。

## 【0007】

本発明で用いるOCIFは、例えばW096/26217号公報に記載された方法により得られる天然型あるいは遺伝子組み換え型のものであり、その由来は特に限定されないが、特に好ましくはヒト型のものである。

又、その類縁体、あるいは変異体を用いても良い。類縁体としては、IMR-90細胞(ATCC CCL-186)のポリ(A)<sup>+</sup> RNAを用いて作成したcDNAライブラリーから、OCIFcDNA断片をプローブとしてハイブリダイゼーション法により得られるOCIF類縁体のcDNAを発現ベクターに挿入し、そのベクターを通常用いられる宿主で発現し、常法により精製することにより得られるもの等が挙げられる。より具体的には、W096/26217号公報に記載されたOCIF2、OCIF3、OCIF4、又はOCIF5が挙げられる。

## 【0008】

変異体としては、OCIFのアミノ酸配列に対し1以上のアミノ酸が挿入、付加、置換、あるいは欠失されたものが挙げられる。より具体的には、OCIFcDNAにPCR法あるいは制限酵素による切断により置換あるいは欠失変異を入れたOCIF変異体cDNAを作成し、このcDNAを発現ベクターに挿入し、そのベクターを通常用いられる宿主で発現し、常法により精製することにより得られるものが挙げられる。

## 【0009】

本発明で用いる多糖類は、単糖がグリコシド結合によって生じた重合体(グルカン)であり、好ましくは構成単糖が2種以上からなるヘテロ多糖(ヘテログリカン)である。具体的には、天然多糖類として例えばヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、ケラタン硫酸、又はヘパリンなど、合成多糖類としては例えばデキストランなど、又、合成多糖類の誘導体としては例えばデキストラン硫酸などが用いられる。特に好ましくはグルカンが硫酸エステル化されたものが用いられ、例えばヘパリンは分子量3,000~6,000のものを、デキストラン硫酸は分子量5,000~10,000のものをを用いる。

## 【0010】

本発明の骨代謝異常症治療剤は、OCIF、その類縁体、又はその変異体からなる群から選択される一以上の物質、及び多糖類又はその誘導体を、多糖類又はその類縁体がOCIF、その類縁体、又はその変異体に対し1～100倍量、特に1～16倍量の割合で組み合わせるのが好ましい。OCIF、その類縁体、又はその変異体からなる群から選択される一以上の物質、及び多糖類又はその誘導体を組み合わせた本発明製剤は、OCIF単独投与に比べて持続性と治療効果が優れた骨代謝異常症治療剤として、例えば骨粗鬆症、高カルシウム血症、慢性関節リウマチ等の骨代謝異常症に対して有効である。

#### 【0011】

本発明の製剤は、ヒトあるいは動物に対し、医薬として経口的及び非経口的に安全に投与される。非経口的投与としては、例えば静脈注射、筋肉内注射、皮下注射、経鼻投与、口腔内投与、経粘膜投与等が挙げられる。これらの投与経路で投与するための製剤は公知の製剤学的製法に準じ、製剤として薬理学的に許容され得る担体、賦形剤、滑沢剤、着色剤等と共に医薬品組成物として投与される。注射剤を調製する場合は、OCIF及び多糖類の他に、必要に応じpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加して、常法により注射剤とする。その際、ヒト血清アルブミンや界面活性剤等の公知の添加剤を併用してもよい。界面活性剤としては、例えばポリアニオン類や陰イオン性の界面活性剤等が挙げられる。注射剤はバイアル瓶に分注し溶液製剤にするか、あるいは凍結乾燥製剤として、用時に適時蒸留水や生理的食塩水等に溶解することによって調製することができる。

OCIFを3又は24mg/kg・dayの用量で正常ラットに1日1回2週間連続静脈内投与したところ、骨密度と骨量の増大が確認されたが、38組織における組織病理学的な異常や血球数の変動等は観察されなかった(H. Yasuda et al.: Endocrinology, Vol.139, pp1329-1337(1998))。このように、OCIFの作用は骨に特異性が高く、安全にヒトに投与できることが期待される。

#### 【0012】

本発明の骨代謝異常症治療剤を患者に投与する場合の投与量と投与方法は、症状の程度、患者の年齢、健康状態、体重などの条件によって異なるので特に限定



されないが、例えば成人 1 日当たり約 0.01~1mg/kg を非経口的に 1 日 1~数回投与すれば良い。又、本発明製剤の活性は、血清カルシウムの濃度を測定することにより行うことができる。例えば、適当な溶媒を用いて調製した OCIF 溶液に多糖類を添加したものをラットに静脈内投与し、経時的に採血を行いその血清カルシウム濃度を常法により測定することにより行うことができる。

【0013】

また、本発明は、多糖類又はその誘導体を用いて破骨細胞形成抑制因子の活性を高める方法に関する。本発明によると、OCIF の血中濃度を高め、OCIF の血清カルシウム濃度低下作用を増強することができる。

【0014】

【実施例】

以下の実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示したのみであり、これらによって本発明は何ら限定されるものではない。

【0015】

【実施例 1】

注射剤の製造・1

W096/26217 号公報記載の方法に従って得られたヒト OCIF 500  $\mu$ g 及びヘパリン 2 mg を、0.15M NaCl 及び 0.01% Tween 80 を含む 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 5ml に溶解し、この溶液を 0.22  $\mu$ m の滅菌フィルター (Millex GV, ミリポア社) で滅菌した後、バイアル瓶に充填することにより静注用注射剤を得た。

【0016】

注射剤の製造・2

W096/26217 号公報記載の方法に従って得られたヒト OCIF 500  $\mu$ g 及びデキストラン硫酸 2 mg を、0.15M NaCl 及び 0.01% Tween 80 を含む 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) 5ml で溶解し、この溶液を 0.22  $\mu$ m の滅菌フィルター (Millex GV, ミリポア社) で滅菌した後、バイアル瓶に充填することにより静注用注射剤を得た。

【0017】

【実施例 2】

多糖類の添加によるOCIFの血清カルシウム濃度低下効果

ヒト OCIF(ダイマー型)(W096/26217号公報記載の方法により得られた遺伝子組換え型OCIF)を、0.15M NaCl及び0.01%Tween 80を含む 10mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)(以下、溶媒と称す)に溶解して調製したヒトOCIF 0.25mg/ml溶液 2mlに、デキストラン硫酸(分子量8000又は10000 : シグマ社、及び分子量5000又は50000 : 和光純薬社)あるいはヘパリン(207.8 又は 171.2 unit/mg : 和光純薬社、及び分子量3000又は6000 : シグマ社) 2mgを溶解した後、4℃で一昼夜放置した。同時にヒト型OCIF 0.25 及び2.5 mg/ml 溶液並びに溶媒についても、4℃で一昼夜放置した。これらの被験試料液を、それぞれOCIFとデキストラン硫酸投与群(D群)、OCIFとヘパリン投与群(H群)(D群及びH群はOCIF量として0.5mg/kg投与)、OCIF単独投与群(OCIF量として0.5mg/kg及び5mg/kg投与)、及び溶媒投与群として準備した。4週齢の雌性ウイスター系ラットに2ml/kgの用量で静脈内単回投与した。投与3時間後に眼窩採血を行い血清を調製し、得られた血清中のカルシウム濃度をカルシウムCテスト(和光純薬社)を用いて測定した。結果を図1に示す。この結果、種々のデキストラン硫酸あるいはヘパリンを添加した0.5mg/kgヒトOCIF投与により、有意な血清カルシウム濃度低下作用の増強効果が認められた。従って、多糖類の添加により、ヒトOCIFの血清カルシウム濃度低下作用を増強できることが確認された。

【0018】

## 【実施例3】

多糖類の添加量によるOCIFの作用増強効果

実施例2と同様に調製したヒトOCIF 0.25mg/ml溶液 2mlに、ヒトOCIFに対してデキストラン硫酸(分子量5000 : 和光純薬社)1, 2, 4, 8, 16倍重量を溶解した後、4℃で一昼夜放置した。同様に、ヘパリン(207.8 units/mg : 和光純薬社)も同じ比率でヒト型OCIF 0.25mg/ml溶液 2mlに溶解し、4℃で一昼夜放置した。

さらに、4 mg/ml に調製したデキストラン硫酸又はヘパリン溶液、0.25 及び2.5 mg/ml に調製したヒトOCIF溶液、及び溶媒のみにについても、同様に4℃で一昼夜放置した。これらの被験試料液を、4週齢の雌性ウイスター系ラットに2ml/kgの用量で静脈内単回投与し、投与3時間後に眼窩採血を行い、血清を調製した

。得られた血清中のカルシウム濃度を、カルシウムCテスト（和光純薬社）を用いて測定した。結果を図2に示す。この結果、デキストラン硫酸を、ヒトOCIFに対し4倍量以上添加した場合に、有意な血清カルシウム濃度低下作用が認められた。又、ヘパリンを、ヒトOCIFに対し等量を添加した場合でも、有意な血清カルシウム濃度低下作用が認められた。従って、ヒトOCIFと多糖類を特定の割合で同時に投与することにより、OCIFの血清カルシウム濃度低下作用がさらに増強されることが確認された。

【0019】

#### 【実施例4】

##### 多糖類の添加によるOCIFの持続性増強効果

溶媒で調製したヒトOCIF 2.5mg/ml 溶液 2mlに、デキストラン硫酸（分子量5000：和光純薬社）20mgを溶解した後、4℃で一昼夜放置した。ヘパリン（207.8 units/mg：和光純薬社）20mgもヒトOCIF 2.5mg/ml 溶液 2mlに溶解し、同様に4℃で一昼夜放置した。さらに、2.5 mg/mlに調製したヒトOCIF溶液及び溶媒についても、4℃で一昼夜放置した。得られた被験試料液を、4週齢の雌性ウィスター系ラットにそれぞれ2ml/kg（OCIF量として5mg/kg）の用量で静脈内単回投与し、投与3, 6, 9時間後に眼窩採血を行い、血清を調製した。得られた血清中のカルシウム濃度を、カルシウムCテスト（和光純薬社）を用いて測定した。結果を図3に示す。この結果、5mg/kgヒトOCIF溶液単独投与群では、投与3時間後で有意な血清カルシウム濃度の低下は認められたものの、投与6及び9時間には血清カルシウム濃度低下作用は認められなかった。

一方、ヒトOCIFに対して4倍量のデキストラン硫酸又はヘパリンを添加した2.5 mg/ml ヒトOCIF溶液は、投与9時間後でも有意な血清カルシウム濃度低下作用を有することが認められた。従って、ヒトOCIFと多糖類を同時に投与することにより、持続性増強効果が得られることが確認された。

【0020】

#### 【実施例5】

##### 多糖類の添加による血中OCIF濃度の持続効果

実施例2と同様に調製したヒトOCIF 1 mg/ml 溶液 1mlにデキストラン硫酸 4 mg

/ml 溶液 1mlを加え、4℃で一昼夜放置した。この被験試料液を、9週齢の雄性ウイスター系ラットに1ml/kgの用量で静脈内単回投与し、投与 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480, 600, 720, 1440 分後に眼窩採血を行い血清を調製した。得られた血清中のヒトOCIF濃度を、ダイマー型OCIFを認識するモノクローナル抗体、モノマー型OCIFを認識するモノクローナル抗体(BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol.245, pp382-387(1998))を用いて、W096/26217号公報記載の ELISA法により測定した。尚、全OCIF濃度は、ダイマー型OCIF濃度とモノマー型OCIF濃度の和として求めた。結果を図4及び図5に示す。この結果、500  $\mu$ g/kgヒトOCIF溶液単独投与群に比べて、ヒトOCIFに対して4倍量のデキストラン硫酸を添加したヒトOCIF溶液投与群は、明らかに高い血中OCIF濃度を維持した(図4)。また、ダイマー型OCIFからモノマー型OCIFへの血中で変換が抑制されることが確認された(図5)。従って、多糖類を添加することにより、OCIF血中濃度、特に血清カルシウム濃度低下活性の高いダイマー型 OCIF(BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Vol.245, pp382-387(1998))の血中濃度が持続される。

【0021】

【発明の効果】

本発明により、破骨細胞形成抑制因子、その類縁体、又はその変異体から選択される一以上の物質、及び多糖類又はその誘導体からなる骨代謝異常症治療剤が提供される。本発明により、骨粗鬆症、高カルシウム血症、慢性関節リウマチ等の骨代謝疾患に対して優れた治療効果を有し、その活性を長時間維持できる骨代謝異常症治療剤が提供され、医薬として有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】

実施例2における、OCIFに多糖類を添加した製剤の、投与3時間後の血清カルシウム濃度を示す。

【符号の説明】

D-1 : OCIF 0.5mg/kg+デキストラン硫酸(分子量 5,000) 2mg/kg

D-2 : OCIF 0.5mg/kg+デキストラン硫酸(分子量 8,000) 2mg/kg

D-3 : OCIF 0.5mg/kg+デキストラン硫酸 (分子量10,000) 2mg/kg

H-1 : OCIF 0.5mg/kg+ヘパリン (207.8 units/mg) 2mg/kg

H-2 : OCIF 0.5mg/kg+ヘパリン (171.2 units/mg) 2mg/kg

H-3 : OCIF 0.5mg/kg+ヘパリン (分子量 3,000) 2mg/kg

H-4 : OCIF 0.5mg/kg+ヘパリン (分子量 6,000) 2mg/kg

\*\* : 危険率 1 %以下で有意差あり

【図 2】

実施例 3 における、OCIFと多糖類の混合比を変えて投与した時の、投与 3 時間後の血清カルシウム濃度を示す。

【符号の説明】

\*\* : 危険率 1 %以下で有意差あり

【図 3】

実施例 4 における、OCIFに多糖類を添加した製剤を投与した時の、投与 3, 6, 9時間後のそれぞれの血清カルシウム濃度を示す。

【符号の説明】

\*\* : 危険率 1 %以下で有意差あり

【図 4】

実施例 5 における、OCIFに多糖類を添加した製剤を投与した時の、経時的な血中OCIF濃度の変化を示す。

【符号の説明】

A : ダイマー型OCIFの血中濃度を示す図。

B : モノマー型OCIFの血中濃度を示す図。

● : OCIF

○ : OCIF+デキストラン硫酸

【図 5】

実施例 5 における、OCIFに多糖類を添加した製剤を投与した時の、モノマー型／ダイマー型OCIFの血中における割合の経時変化を示す。

A : OCIF

B : OCIF+デキストラン硫酸

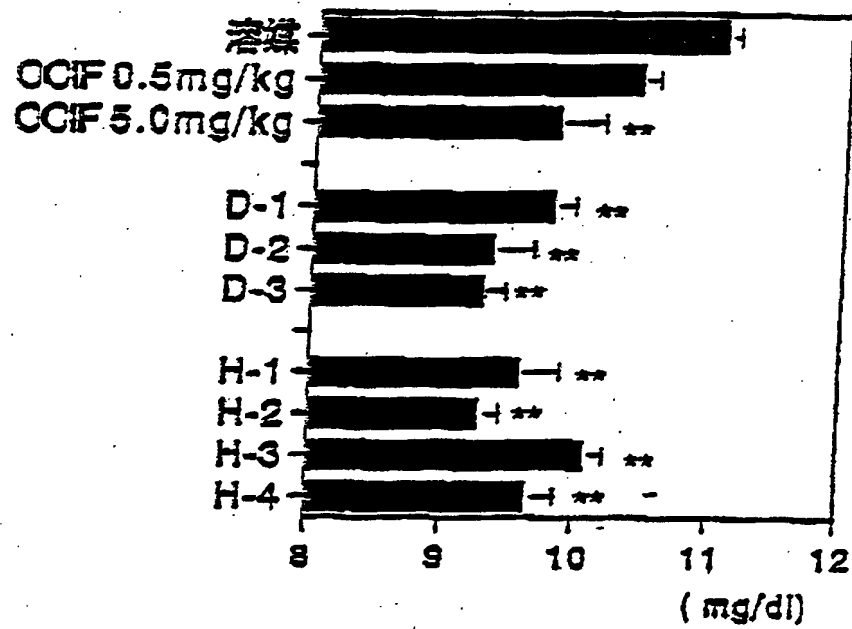
○：ダイマー型OCIF

△：モノマー型OCIF

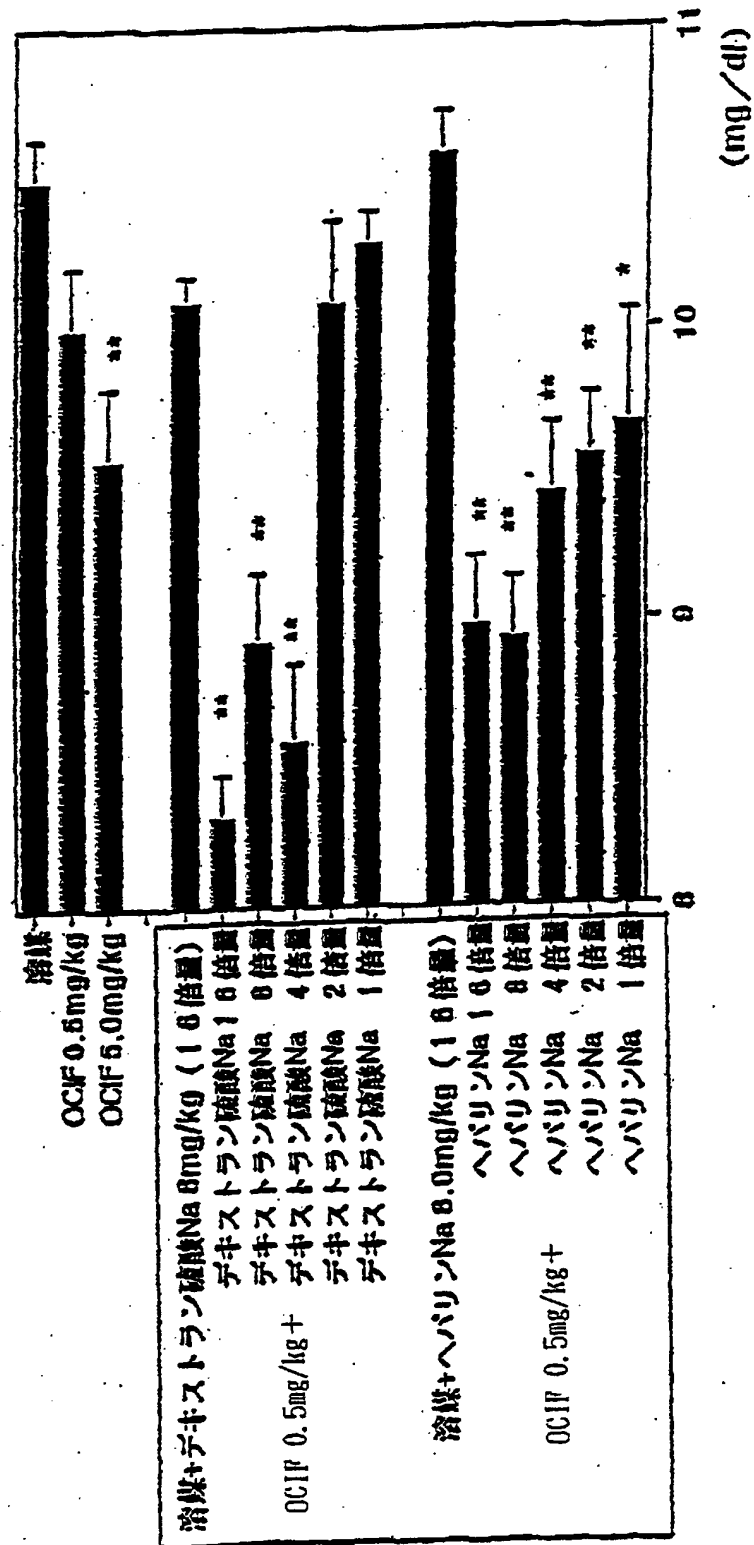
【書類名】

図面

【図 1】

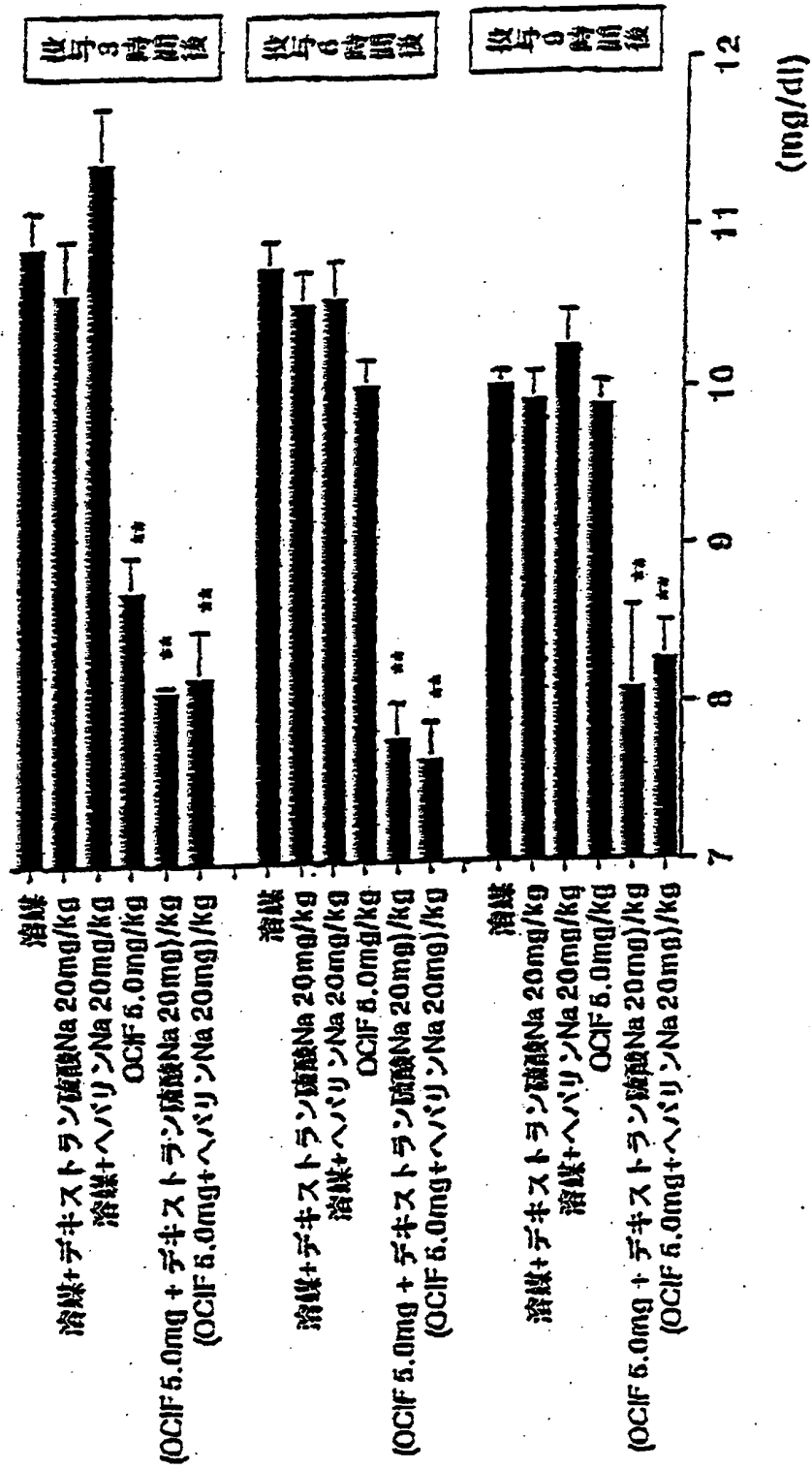


【図2】



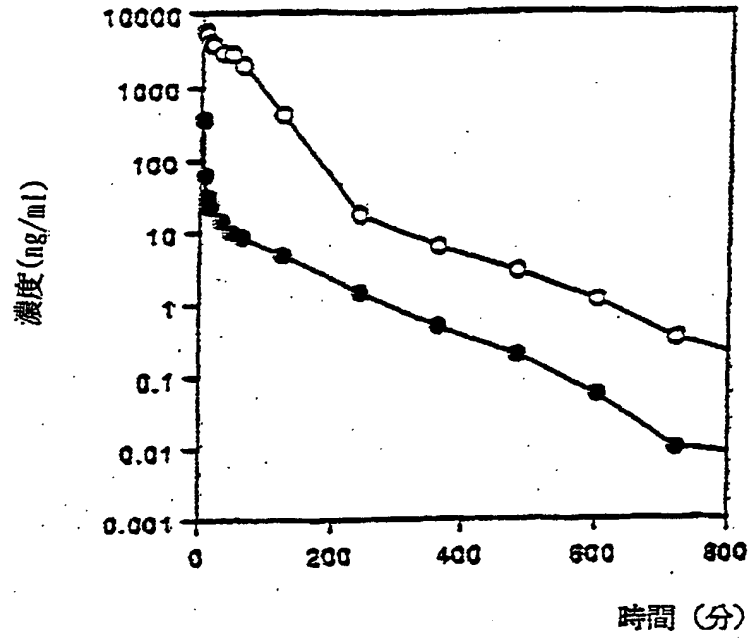


【図3】

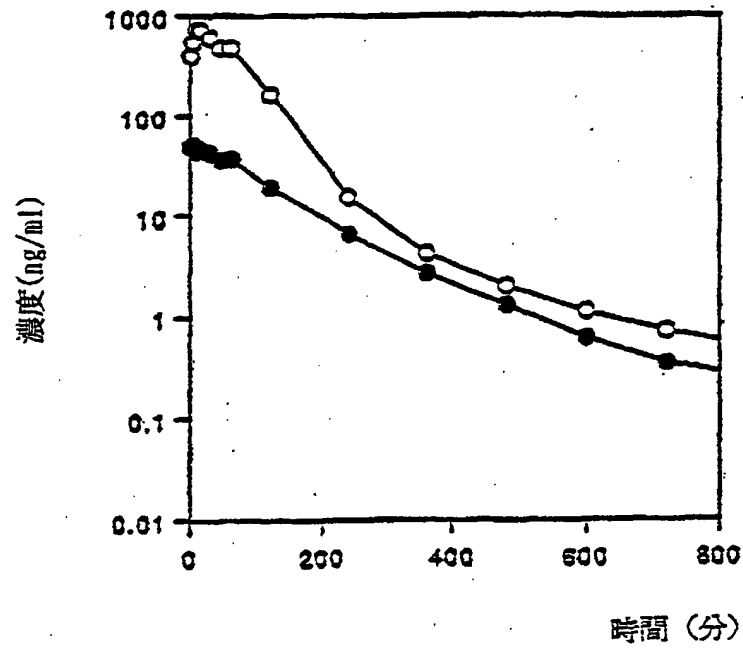


【図 4】

A

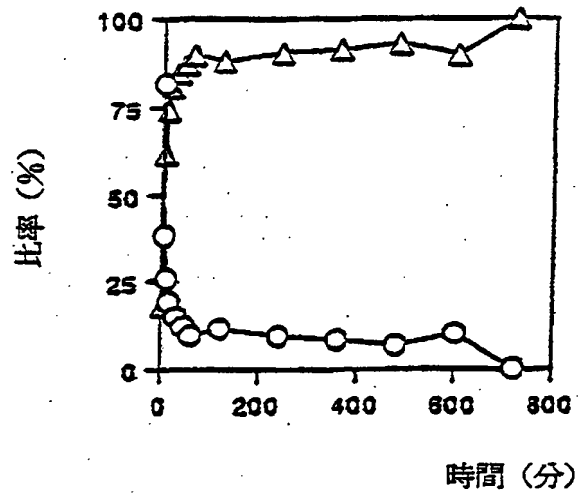


B

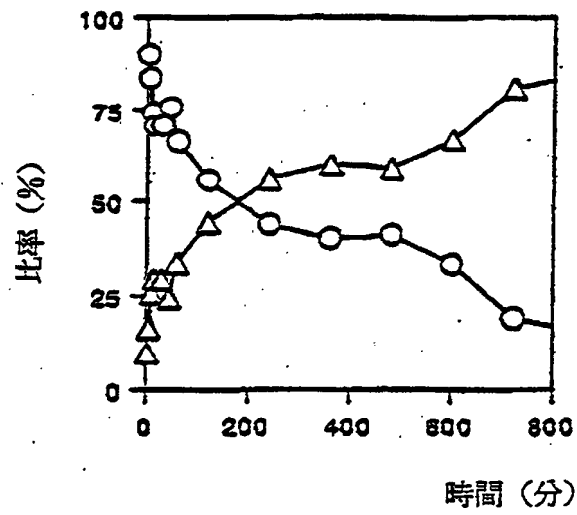


【図 5】

A



B



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な骨代謝異常症治療剤の提供。

【解決手段】 破骨細胞形成抑制因子 (Osteoclastogenesis Inhibitory Factor ; OCIF)、その類縁体、又はその変異体からなる群から選択される一以上の物質、及び多糖類からなる骨代謝異常症治療剤。多糖類としては、デキストラン硫酸、ヘパリン等が用いられる。

【効果】 骨粗鬆症、高カルシウム血症、慢性関節リウマチ等の骨代謝異常症に対して優れた治療効果を有し、その活性を長時間維持できる骨代謝異常症治療剤が提供される。本製剤は、医薬として有用である。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000006699  
【住所又は居所】 北海道札幌市東区苗穂町 6 丁目 1 番 1 号  
【氏名又は名称】 雪印乳業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000001856  
【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町 3 丁目 5 番 1 号  
【氏名又は名称】 三共株式会社

【代理人】

申請人

【識別番号】 100090941  
【住所又は居所】 東京都新宿区四谷 1 丁目 2 番 1 号 三浜ビル 8 階  
藤野特許事務所  
【氏名又は名称】 藤野 清也

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006699]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

氏 名 雪印乳業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001856]

1. 変更年月日 1990年 8月15日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号  
氏 名 三共株式会社
2. 変更年月日 2003年 4月15日  
[変更理由] 名称変更  
住 所 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号  
氏 名 三共株式会社